06-03

# Toxi-Blocker™

## Transfection Supplement

(Code No. TFP-101)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department

OSAKA JAPAN

A3558K

# ― 目 次 ―



[ご注意]

本製品は研究用試薬です。診断･臨床用試薬として決して使用しないでください。

また、本製品の使用にあたっては実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

## [1] はじめに

近年、リポソームをはじめ、様々な物質をキャリアーとした動物細胞への核酸のトランスフェクション法が開発され、広く使用されています。しかし、条件によっては、核酸の導入と同時に、細胞毒性も生じてしまい、良い実験結果が得られない場合もあるようです。Toxi-Blocker™ Transfection Supplement は、核酸を動物細胞にトランスフェクションする際に生ずる細胞毒性(Toxi)をブロック(Block)し、生存率を向上させる添加剤(Supplement)です。Toxi-Blocker™には、遺伝子導入効率を高める効果はありません。

特長１ 簡便

- 使用方法は、トランスフェクション後に、Toxi-Blocker™を添加するだけです(図 1)。
- トランスフェクション条件は変更の必要がありません。
- 多くの場合において、遺伝子導入効率を低下させることなく、生存率を高めることができます。また、細胞の形態変化等も低く抑えることができます。

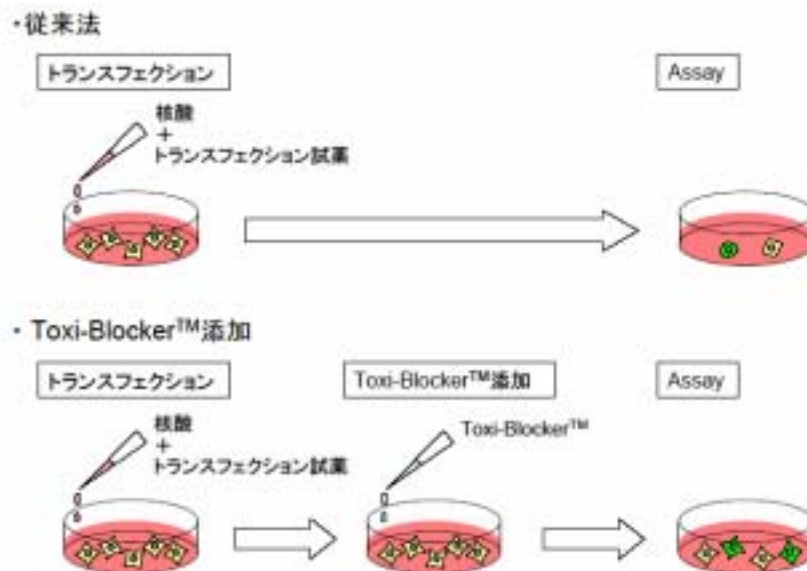



図 1 Toxi-Blocker™を用いた実験フロー

## [2] 本製品に含まれるもの

| 品名 | コード | 包装 | 保存温度 |
|---|---|---|---|
| Toxi-Blocker™ Transfection Supplement | TFP-101 | 1ml | 4℃ |

## [3] ご用意いただくもの

（1）細胞

遺伝子導入の対象となる細胞をご用意ください。当社では、HeLa、COS-7、PC-12、Neuro 2a 細胞において、Toxi-Blocker™による細胞毒性の低減を確認しています。

（2）トランスフェクション試薬

各社より販売されているトランスフェクション試薬を用い、核酸の導入を行ってください。とりわけ、細胞毒性の比較的強い試薬を用いた場合、Toxi-Blocker™の細胞毒性低減効果がより顕著に現れます。

## [4] プロトコール

ここでは本製品を使用する場合の、標準的なプロトコールを示します。

Step1. 市販のトランスフェクション試薬を用い、核酸の導入を行います。

注）Toxi-Blocker™は、トランスフェクション前には決して添加しないでください。
注）トランスフェクション条件は、各々のトランスフェクション試薬の取扱説明書を参考に設定してください。

Step2. トランスフェクションの 5～7 時間後に、培養液量の 1%を目安に、Toxi-Blocker™を培地中に添加します。

注）Toxi-Blocker™添加のタイミングは、細胞毒性の低減効果、遺伝子導入効率に大きく影響します。本試薬添加のタイミングは、トランスフェクションの 5～7 時間後を目安に最適化することをお薦めします。特に、細胞毒性の低減効果を更に増強するためには、トランスフェクションから本試薬の添加までの時間を、3 時間までを目安に短縮してください。一方、遺伝子導入効率や発現量の低下が認められる場合は、トランスフェクションから本試薬の添加までの時間を、12 時間までを目安に延長してください。
注）Toxi-Blocker™の添加量は、まずは、培養液量の 1%で行ってください。十分な効果が得られない場合は、添加量を培養液量の 0.2～5%の範囲内でご検討ください。
注）Toxi-Blocker™を添加する際に、同時に培地交換も行うことで、更に細胞毒性を低減できることがあります。

Step3. 更に、24～72 時間培養します。

注）培養時間が 24 時間では、細胞毒性の低減効果が不十分なことがあります。その場合は、培養時間を 36～72 時間までを目安に延長してください。
注）Assay の際、Toxi-Blocker™が結果に影響を及ぼす可能性があります。そのため、Assay の前に培地を交換する、あるいは、トランスフェクションを行わず、Toxi-Blocker™のみ添加したウェルを用意するなどの対策を実施することをお薦めします。

以下に本製品の使用例をお示しします。ご参考ください。

（1）Neuro 2a 細胞（マウス神経芽細胞腫由来）

Step0. トランスフェクション前日に、12 ウェルプレートに Neuro 2a 細胞を播種しました（$1.0 \times 10^5$ cells/well）。

Step1. 1.6μg の β-gal 発現プラスミド、4.0μl の Lipofectamine™ 2000 Reagent（Invitrogen 社）を用い、トランスフェクションを実施しました。

※Lipofectamine™は、Invitrogen 社の商標です。

Step2. トランスフェクションの 4～10 時間後、10μl の Toxi-Blocker™を添加しました。

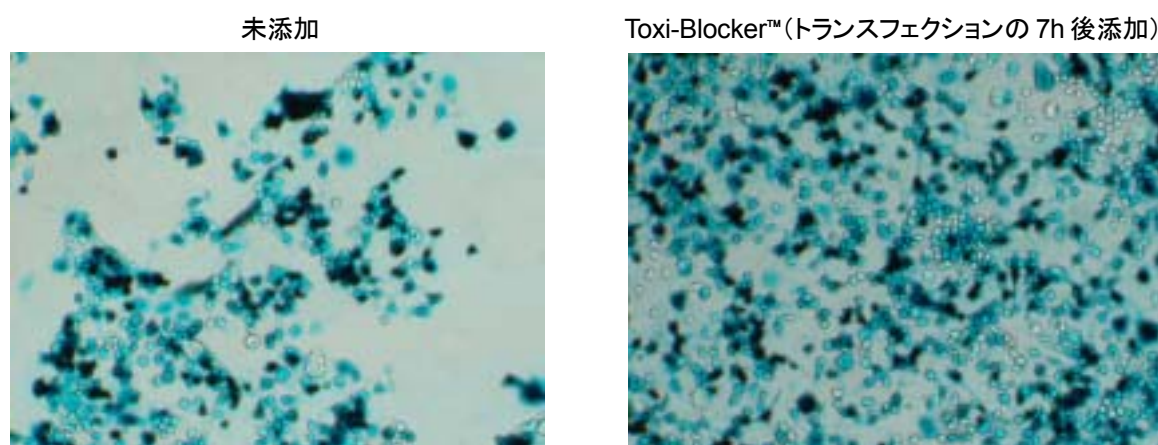
Step3. 更に、48 時間培養後、細胞生存率、遺伝子導入効率を算出しました。（図 2、3 参照）

未添加

図 2 β-gal 染色結果（Neuro 2a 細胞）

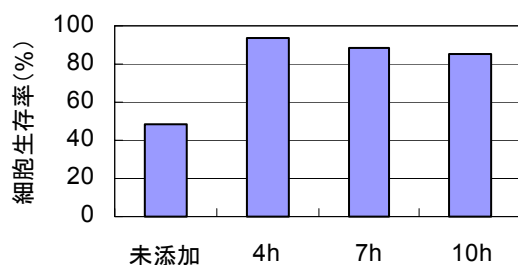
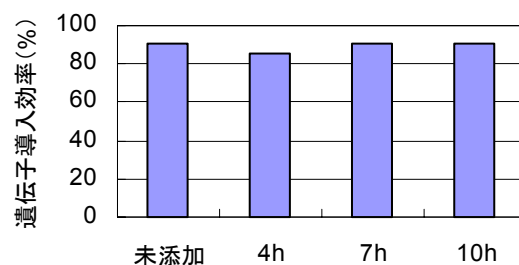



図 3 Neuro 2a 細胞での Toxi-Blocker™添加タイミングの検討結果

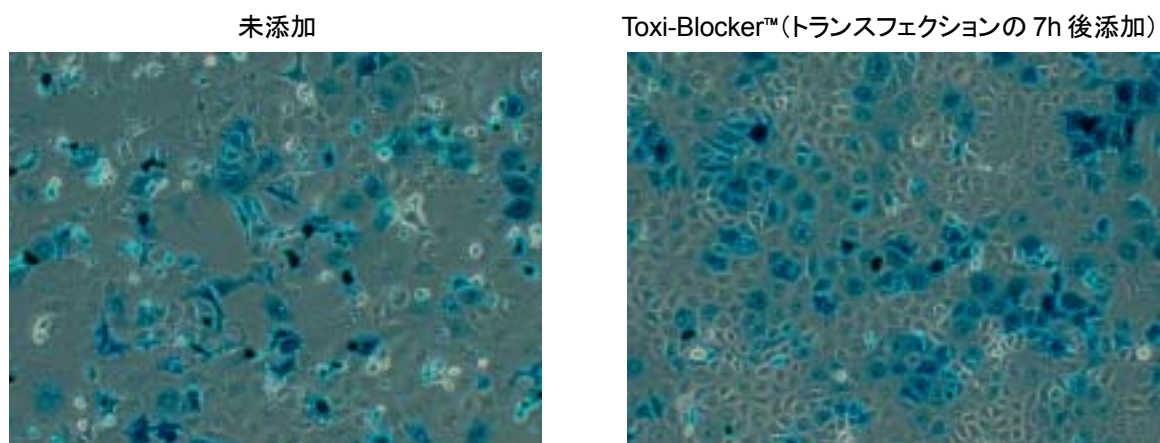
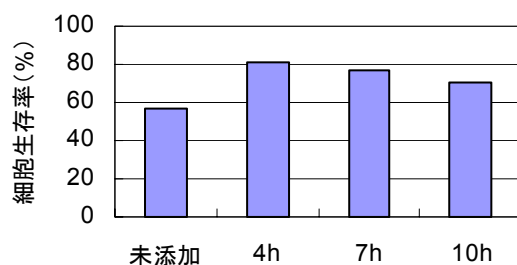
（2） COS-7 細胞（アフリカミドリザル腎由来）

Step0. トランスフェクション前日に、12 ウェルプレートに COS-7 細胞を播種しました（1.0 ×$10^5$ cells/well）。

Step1. 1.0μg の β-gal 発現プラスミド、2.5μl の Lipofectamine™ 2000 Reagent（Invitrogen 社）を用い、トランスフェクションを実施しました。

※Lipofectamine™は、Invitrogen 社の商標です。

Step2. トランスフェクションの 4～10 時間後、10μl の Toxi-Blocker™を添加しました。

Step3. 更に、48 時間培養後、細胞生存率、遺伝子導入効率を算出しました。（図 4、5 参照）

未添加

Toxi-Blocker™（トランスフェクションの 7h 後添加）

図 4 β-gal 染色結果（COS-7 細胞）

細胞生存率

遺伝子導入効率

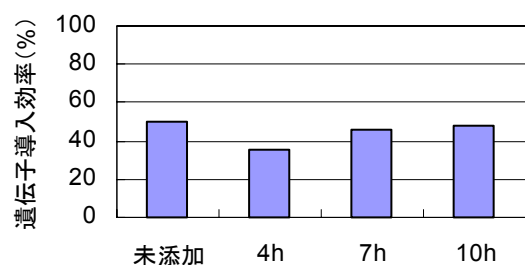



図 5 COS-7 細胞での Toxi-Blocker™添加タイミングの検討結果

## ［5］ トラブルシューティング

| トラブル | 考えられる原因 | コメント |
| --- | --- | --- |
| 遺伝子導入が認められない | トランスフェクション試薬あるいは条件が不適当 | ・トランスフェクション試薬あるいは条件を変更し、検討してください。 |
| | Toxi-Blocker™ 添加のタイミングが不適切 | ・Toxi-Blocker™添加のタイミングはトランスフェクションの 5～7 時間後を目安にご検討ください。 |
| 遺伝子導入効率が低下 | Toxi-Blocker™ 添加のタイミングが早い | ・トランスフェクションから Toxi-Blocker™の添加までの時間を、12 時間までを目安に延長してください。 |
| | Toxi-Blocker™の添加量が不適切 | ・Toxi-Blocker™の添加量は培養液量の 0.2～5%の範囲内でご検討ください。 |
| 細胞毒性の低減が認められない | Toxi-Blocker™ 添加のタイミングが不適切 | ・Toxi-Blocker™添加のタイミングはトランスフェクションの 5～7 時間後を目安にご検討ください。 |
| | 細胞と Toxi-Blocker™の相性が悪い | ・もともと細胞毒性が現れていない場合、および Toxi-Blocker™を添加しても、細胞毒性の低減が認められない場合は、本試薬の使用はお薦めできません。 |
| 細胞毒性の低減効果が弱い | Toxi-Blocker™ 添加のタイミングが遅い | ・トランスフェクションから Toxi-Blocker™の添加までの時間を、3 時間までを目安に短縮してください。 |
| | Toxi-Blocker™の添加量が不適切 | ・Toxi-Blocker™の添加量は培養液量の 0.2～5%の範囲内でご検討ください。 |
| | Toxi-Blocker™の効果が不十分 | ・Toxi-Blocker™の添加時に、培地交換を行ってください。 |
| 再現性が低い | 実験条件のばらつき | ・細胞の培養条件、トランスフェクション条件、Toxi-Blocker™添加条件など、実験条件を確認してください。 |

【製造・販売元】

TOYOBO 東洋紡績株式会社

ー納期・注文に関するお問い合わせー

ライフサイエンス事業部 （大阪）
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

ライフサイエンス事業部 （東京）
〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町 17 番 9 号
TEL 03-3660-4819 FAX 03-3660-4951
E-mail : order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00 （土、日、祝を除く）
E-mail : techosk@bio.toyobo.co.jp
［URL］ http://www.toyobo.co.jp/bio